



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**DETERMINACIÓN DEL METABOLITO TÓXICO AFLATOXINA M₁ EN
LECHES CRUDA, PASTEURIZADA Y ULTRAPASTEURIZADA
CONSUMIDAS EN LA CIUDAD DE CUENCA MEDIANTE LA TÉCNICA DE
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).**

Tesis previa a la
Obtención de título de
Bioquímica Farmacéutica.

AUTORES:

- ANA CRISTINA MALLA BRAVO.
- SANDRA VANESSA SAULA LÓPEZ.

DIRECTORA:

Dra. María Fernanda Uguña Rosas. Mg.

ASESORA:

Dra. Johana Ortiz Ulloa. Ph.D.

CUENCA - ECUADOR

2015

RESUMEN

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos muy potentes con efectos cancerígenos, teratogénicos, mutagénicos, hepatotóxicos e inmunosupresores, que constituyen un riesgo potencial para salud de los seres humanos, por lo que deben ser considerados como un problema latente que requiere ser examinado continuamente con el fin de garantizar la calidad de los alimentos.

Este estudio se realizó con el objetivo de determinar cuantitativamente el contenido de Aflatoxina M_1 en tres tipos de leche cruda, pasteurizada y ultra pasteurizada consumidas en la ciudad de Cuenca, mediante la Técnica de Cromatografía Líquida de alta resolución HPLC, tras un proceso de extracción en columnas de inmovilización.

Se efectuó el análisis de 84 muestras en total y para cada clase de leche se realizaron dos muestreos correspondientes cada uno a diferentes lotes de producción, tres muestras por cada lote, es decir seis muestras por marca en el caso de las leches entera y descremada UHT y dos muestras en el caso de la leche entera pasteurizada y la leche cruda. Se encontraron 16 muestras positivas que estaban entre el límite de detección y cuantificación (0,09 – 0,18 p.p.b.), obteniéndose una prevalencia del 19%.

Los valores de AFM_1 fueron inferiores a la concentración permitida por la normativa nacional vigente INEN 9-10 (0,5 p. p.b.) e internacionalmente por la FDA (0,5 p.p.b.); por lo que, la concentración de AFM_1 en las leches analizadas por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución HPLC no contiene niveles que constituyan un peligro para la salud de la población consumidora.

PALABRAS CLAVES: leche, aflatoxina M_1 , HPLC.

ABSTRACT

Aflatoxins are very powerful and immunosuppressive toxic metabolites carcinogenic, teratogenic, mutagenic, hepatotoxic, which constitute a potential health risk to humans, so it should be considered as a potential problem that needs to be continually reviewed in order to ensure the quality of food.

This study was conducted to quantitatively determine the content of aflatoxin M₁ in three types of raw milk, pasteurized and ultra-pasteurized consumed in the city of Cuenca, by the technique of high performance liquid chromatography HPLC resolution, following an extraction process immunoaffinity columns.

Analyzing 84 samples in total, it was made for each kind of milk two corresponding samples each in different production batches, three samples per lot, ie six samples by mark in the case of whole and skimmed milk were carried out UHT and two samples in the case of whole milk pasteurized and raw milk. , Giving a prevalence of 19% - 16 positive samples that were between the detection limit and quantification (0.18 ppb 0.09) were found.

AFM₁ values were lower than that permitted by current national regulations INEN 9-10 (0.5 ppb) and internationally by the FDA (0.5 ppb) concentration; therefore, the concentration of AFM₁ in milk analyzed by the technique of high performance liquid chromatography HPLC resolution does not contain levels that constitute a danger to the health of the consumer population.

KEY WORDS: milk, aflatoxin M₁, HPLC.

CONTENIDO

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
AGRADECIMIENTO	12
DEDICATORIA	14
DEDICATORIA	15
INTRODUCCIÓN	16
MARCO TEÓRICO	18
1.1 MICOTOXINAS	19
1.2 AFLATOXINAS	20
1.2.1 Aspergillus como agente productor de aflatoxinas.....	21
1.2.2 Estructura química de las aflatoxinas	22
1.3 FACTORES QUE AFECTAN AL DESARROLLO FÚNGICO Y A LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS	23
1.3.1 Agentes físicos	24
1.3.2 Factores Químicos	24
1.4. AFLATOXINA M ₁	25
1.5 TOXICIDAD.....	26
1.6. ESTABILIDAD DE LA AFM ₁ ; PREVENCIÓN Y DETOXIFICACIÓN.	26
1.7. COMPOSICIÓN DE LA LECHE	27
1.7.1. Características físicas de la leche	28
1.9. LÍMITES DE AFM ₁ EN LECHE CRUDA, PASTEURIZADA Y ULTRAPASTEURIZADA SEGÚN LA NORMATIVA INEN Y LA NORMATIVA INTERNACIONAL FDA.....	31
METODOLOGÍA	32
2.1 TIPO DE ESTUDIO Y DISEÑO.	33

2.2 DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN	33
2.2.1 Población, muestra y muestreo	33
2.3 ANÁLISIS DE AFM ₁	35
2.3.1. Equipos, materiales y reactivos para la cuantificación de aflatoxinas AFM ₁	35
2.3.2 Fundamento de la cromatografía líquida de alta resolución HPLC.....	36
2.3.3. Condiciones cromatográficas en hplc para el análisis de aflatoxina M ₁	37
2.3.4 Técnica para la extracción de AFM ₁	38
2.4. PROCEDIMIENTO.....	39
2.4.1. Preparación de la muestra	39
2.4.2. Clean up	39
2.6 ANÁLISIS DE DATOS	40
2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
3.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS	43
3.2 CURVA DE CALIBRACIÓN.....	45
3.3 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE AFM ₁ EN LECHE POR HPLC. ...	47
CONCLUSIONES	49
RECOMENDACIONES.....	51
BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXOS	57
GLOSARIO	62

Índice de tablas:

Tabla 1.1: Requisitos fisico-químicos de la leche cruda-pasteurizada y larga vida.	30
Tabla 1.2: Límite máximo de AFM ₁ para la leche cruda-pasteurizada.	31
Tabla 2.1: Muestras de leche recolectadas para el análisis.	34
Tabla 2.1: Reactivos requeridos para el análisis de AFM ₁ por HPLC.	35
TABLA3.1: Porcentaje y número total de muestras de leche analizadas de tres supermercados de la ciudad de Cuenca y de la Hacienda Santa Cecilia de la parroquia Tarqui.	43
Tabla3.2: Muestras de leche recolectadas según marca, tipos, tipo de tratamiento térmico, número de muestras seleccionadas, números de lote y lugar de recolección.	44
TABLA3.3: Tabla de patrones para la elaboración de la curva de calibración de AFM ₁	45
TABLA. 3.4: Resultados de AFM ₁ según el tipo de leche.	47



Índice de figuras

figura1. 1: Estructura química de las principales aflatoxinas.....	23
figura. 2.1 Equipo de cromatografía de alta resolución HPLC	37
figura 3.1. Curva de calibración de los patrones para la determinación de AFM ₁	46



Yo, Sandra Vanessa Saula López autora de la tesis "DETERMINACIÓN DEL METABOLITO TÓXICO AFLATOXINA AFM₁ EN LECHE CRUDA, PASTEURIZADA Y ULTRAPASTEURIZADA CONSUMIDAS EN LA CIUDAD DE CUENCA MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)." reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, 21 de diciembre de 2015.



Vanessa Saula López

0302301957



Yo, Ana Cristina Malla Bravo, autora de la tesis "DETERMINACIÓN DEL METABOLITO TÓXICO AFLATOXINA AFM₁ EN LECHE CRUDA, PASTEURIZADA Y ULTRAPASTEURIZADA CONSUMIDAS EN LA CIUDAD DE CUENCA MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)." reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, 21 de diciembre de 2015.



Ana Cristina Malla Bravo

0106566292



Yo, Sandra Vanessa Saula López, autora de la tesis "DETERMINACIÓN DEL METABOLITO TÓXICO AFLATOXINA AFM₁ EN LECHE CRUDA, PASTEURIZADA Y ULTRAPASTEURIZADA CONSUMIDAS EN LA CIUDAD DE CUENCA MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)," certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 21 de diciembre de 2015.



Sandra Vanessa Saula López.

0302301957



Yo, Ana Cristina Malla Bravo, autora de la tesis "DETERMINACIÓN DEL METABOLITO TÓXICO AFLATOXINA AFM₁ EN LECHE CRUDA, PASTEURIZADA Y ULTRAPASTEURIZADA CONSUMIDAS EN LA CIUDAD DE CUENCA MEDIANTE LA TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)," certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 21 de diciembre de 2015



Ana Cristina Malla Bravo
0106566292

AGRADECIMIENTO

Gracias mi Dios por acompañarme en toda mi vida y ser mi fortaleza para poder cumplir con mis metas y por darme la oportunidad de conocer a personas maravillosas que me han apoyado a lo largo de mi carrera.

Gracias Virgen Santísima por cubrirme con tu manto y protegerme y cuidarme siempre.

Agradezco a mis padres Ricardo y Rosita por su apoyo, paciencia, cariño y por ser mi pilar fundamental todo lo que soy es gracias a usted.

A mis hermanos Gustavo, Julio y David gracias queridos hermanos por todo su apoyo y cariño.

A la UNIVERSIDAD ESTATAL DE CUENCA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS por darme la oportunidad de estudiar en esta prestigiosa institución y convertirme en una profesional.

A mi directora de tesis, Dra. María Fernanda Uguña Rosas. Mg. por su dedicación, motivación, paciencia y apoyo quien con sus conocimientos y experiencia me ayudado a terminar mi trabajo de investigación con éxito.

A la Dra. Johanna Ortiz. Ph.D. y a la Dra. Gabriela Astudillo mis asesoras de tesis gracias por compartir sus conocimientos conmigo por brindarme su apoyo, amistad y confianza.

Me gustaría agradecer a mis profesores que formaron parte de mi carrera profesional ya que han contribuido con mi formación académica.

A la persona más importante de mi vida gracias mi querida hija por ser mi motor y ayudarme a cumplir esta meta **TE AMO MI PEQUE.**

Muchas gracias A TODOS y que Dios los bendiga.

VANESSA



AGRADECIMIENTO

A la Universidad de Cuenca, noble institución que trabaja infatigable por el futuro de la juventud ecuatoriana, en la que tuve el orgullo de estudiar.

A la Dra. María Fernanda Uguña, Directora de mi tesis, por su paciencia y apoyo quien con sus conocimientos y experiencia me impulso a culminar este trabajo de investigación.

A la Doctoras Johana Ortiz Ulloa. Ph.D. y Gabriela Astudillo, asesoras de mi tesis, quienes compartieron sus conocimientos para la realización del presente trabajo.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en la terminación de mi carrera.

CRISTINA

DEDICATORIA

Mi trabajo de investigación va dedicado a Dios y a mi virgen santísima por guiarme siempre por un buen camino.

A mis padres por todo el amor y apoyo que me brindaron y sobre todo por los buenos valores que me han inculcado toda mi vida.

A mis hermanos y a mis queridos sobrinos Andrés y Gustavito por formar parte de mi vida y apoyarme siempre.

A la personita más importante de mi vida a ti querida hija GABRIELA ALEJANDRA este título profesional es de las dos mi pequeña porque desde el momento que estuviste en mi vientre luchaste igual conmigo para salir adelante no fue fácil para las dos pero lo logramos mi amor gracias hijita por ser mi motor y a seguir cumpliendo nuestros sueños y metas ya que las dos lo podemos todo mi niña TE AMO MI GABY.

Finalmente Mi trabajo va dedicado a todas las personas que confiaron y creyeron en Mí.

VANESSA



DEDICATORIA

A mis padres Manuela y Luis que con su sacrificio, cariño, apoyo incondicional, entusiasmo y confianza que depositaron en mí, hicieron posible alcanzar este título tan anhelado.

A mi novio Adrián por su amor, comprensión, paciencia y apoyo, dándome fuerza y valor para seguir adelante.

CRISTINA

INTRODUCCIÓN

Las Aflatoxinas son metabolitos secundarios generalmente tóxicos, inmunosupresivos y carcinógenos, producidas por diferentes especies de hongos y se encuentran como contaminantes naturales en alimentos. La aflatoxina M_1 (AFM_1) es el metabolito oxidado de la aflatoxina B_1 (AFB_1) y es excretada en la leche materna tanto animal como humana, debido a esto, es muy importante el control sanitario de los animales productores de carne y de leche.

En el presente trabajo se investigó la presencia de aflatoxina M_1 en leche por el riesgo toxicológico que representa su existencia en leche cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada, que son alimentos de consumo masivo, comparando las concentraciones con los valores establecidos para la Normativa Nacional vigente INEN lo que permite conocer su inocuidad o riesgo alimentario.

El estudio realizado es una investigación experimental en la que se aplica el método científico descriptivo analítico, de acuerdo a su direccionalidad es un diseño cuantitativo, observacional. La presente investigación utilizará el método inductivo, se aplicará la técnica cuantitativa de Cromatografía líquida de alta resolución HPLC con una variable independiente la concentración de aflatoxina M_1 en $\mu\text{g/L}$ y como variable dependiente la presencia del metabolito toxico AFM_1 en leche cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada, se aplicó la técnica cuantitativa de Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para el presente trabajo de tesis se planteó como hipótesis que se encontrará diferencias en la concentración de AFM_1 en la leche cruda, pasteurizada y ultra pasteurizada analizada por técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los valores de concentración de AFM_1 en cada tipo de leche superan significativamente los valores de la normativa INEN y de la Food and Drug Administration (FDA), lo que supone un riesgo para la salud de los consumidores de estos productos en la localidad del estudio.

Los objetivos propuestos para la presente investigación fueron:

- Recolectar muestras de leche cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada en los supermercados: Coralcentro, Coralrio, Supermaxi y en la Hacienda Santa Cecilia de la parroquia Tarqui.
- Detectar la presencia de AFM₁ en leches cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada por la técnica de HPLC.
- Cuantificar AFM₁ en las distintas muestras de leche.
- Comparar los resultados obtenidos de la concentración de AFM₁ con los límites establecidos por la Norma Ecuatoriana INEN y la internacional FDA.

MARCO TEÓRICO

I

1.1 MICOTOXINAS

El término micotoxina proviene de dos palabras griegas: “mykes” que significa hongo y “toxicum” que significa veneno.

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos secundarios producidos por cepas toxigénicas de varios géneros y especies de hongos. Los metabolitos fúngicos primarios son aquellas moléculas sintetizadas por el hongo para la formación de biomasa. Cuando el crecimiento del hongo termina o es interrumpido por la depleción de algún nutriente esencial, los procesos de síntesis del hongo se encaminan hacia la producción de metabolitos secundarios. Este grupo de sustancias incluye, pigmentos, antibióticos y micotoxinas, las cuales son producidas en gran cantidad durante la fase estacionaria del hongo. Los factores más importantes implicados en el crecimiento del hongo y la producción de micotoxinas son la humedad ambiental relativa, humedad del alimento, actividad del agua, temperatura de almacenamiento, ventilación y niveles de oxígeno atmosférico, integridad de la cutícula del grano. (Carmean Fernández & Repetto Jiménez, 2012).

Las micotoxinas son altamente tóxicas, actúan como: mutágenicos, cancerígenos, teratógenos e inmunosupresores. La presencia de micotoxinas en los alimentos se considera de alto riesgo para la salud de personas y animales debido a que son termoresistentes y a la gran variedad de efectos tóxicos que causan. (Méndez-Albores & Moreno-Martínez, 2009).

Son compuestos universales que difieren en sus propiedades biológicas, toxicológicas y químicas afectando a la salud de quienes ingieren vegetales, cereales, carne, huevos, granos y leche de animales contaminados con micotoxinas. (Vásquez Santa, 2010).

Se conocen actualmente entre 300 y 400 clases de micotoxinas, de las cuales aquellas que son más importantes por su ocurrencia y toxicidad son: Aflatoxinas (AF), Ocratoxina A (OTA), Citrinina (CIT), tricotecenos (principalmente nivalenol, deoxinivalenol (DON) y

las toxinas T-2 y HT-2) Zearalenona (ZEA), Fumonisin (FB), Moniliformina, Patulina, Esterigmatocistina. (Vásquez Santa, 2010) (Soriano del Castillo, 2011).

Además de los efectos carcinogénicos, también existen otros efectos ocasionados por las micotoxinas en la salud:

1. Alteración en el desarrollo y crecimiento de los niños.
2. Daño al sistema inmunológico
3. Efectos adversos en la reproducción.
4. Disminución en la actividad de ciertas hormonas al instituirse una competencia por los receptores específicos, incluso la AFM₁ en cantidades muy bajas compete con el estradiol por los receptores localizados en el útero.
5. Alteración de la glicolisis y gluconeogénesis
6. Síntomas severos de intoxicación e incluso muerte cuando los niveles tóxicos son muy altos. (Vásquez Santa, 2010) (Combita Prieto & Milderberg Ortiz, 2009).

1.2 AFLATOXINAS

El término aflatoxina, es una palabra compuesta, la primera letra, A, hace referencia al género *Aspergillus*, las tres siguientes, FLA, proceden de la especie *flavus* y el término toxina se refiere a su efecto tóxico. Las aflatoxinas son metabolitos sintetizados por *Aspergillus flavus* o especies afines como *Aspergillus parasiticus* (Valle Vega, 2010).

Las aflatoxinas por lo general afectan a los cultivos en el campo antes de la cosecha. La contaminación post - cosecha puede ocurrir si la humedad del producto es alta durante el almacenaje, pero también se pueden detectar algunas veces en leche, queso, maíz, maní, semilla de algodón, almendras, higos, especias, y una variedad de otros alimentos y piensos. (Soriano del Castillo, 2011).

Existen hasta el momento aproximadamente 20 tipos pero solo cuatro son contaminantes de los alimentos, estas son B₁, B₂, G₁ y G₂ la más tóxica es la aflatoxina B₁ (AFB₁) y la aflatoxina M₁ (AFM₁), siendo esta última un metabolito producto de la biotransformación de la AFB₁, (Torres, Aparicio, & García, 2014), La excreción de la aflatoxina B₁ se produce en un 50% por la bilis, ya metabolizada, y 15 -25% a través de la orina sin metabolizar, mientras que la excreción de la AFM₁ se produce con la leche. (ELIKA, Aflatoxinas, 2013).

Las Aflatoxinas tienen efectos cancerígenos, especialmente a nivel hepático tanto para el hombre como animales al ser ingeridas en gran cantidad o de manera sostenida durante un largo período de tiempo. También son considerados como agentes teratogénicos y mutagénicos, siendo los principales órganos afectados el hígado, riñón y cerebro. (Gimeno & Martins, 2011).

Poseen efectos inmunosupresivos porque inhiben la fagocitosis y la síntesis proteica, impidiendo la síntesis del ADN, ARN y proteínas del ribosoma. (Gimeno & Martins, 2011).

Las aflatoxinas son absorbidas en el tracto gastrointestinal por su alta liposolubilidad y para que su acción tóxica ocurra es necesario de un cambio metabólico, el cual se produce cuando la AFB₁ llega a las células hepáticas, en la función microsomal citocromo P-450 (Guzmán, 2007).

El fenómeno de mutagenicidad puede explicarse mediante la formación de un compuesto estable, en donde el producto final es el AFB₁ exo- 8,9-epóxido, el cual se une con mucha afinidad a la guanina, mediante la unión covalente con el nitrógeno N-7 con los residuos guanil del ADN (o ARN) para formar aductos que inducen depurinación y escisión de la hebra, siendo así responsables del efecto carcinogénico y mutagénico de las aflatoxinas en las células somáticas. (Zumbado, Ulloa , & Rojas, 2014).

La AFB₁- epóxido puede también reaccionar con glutatión mediante un mecanismo mediado por la glutatión -s- transferasa , esta conjugación de tipo competitivo representa el paso de detoxificación más importante con respecto a otros tipos de biotransformación en la obtención de metabolitos menos tóxicos de AFB₁. (Uguña Rosas, 2013).

1.2.1 ASPERGILLUS COMO AGENTE PRODUCTOR DE AFLATOXINAS

Aspergillus flavus y *Aspergillus parasiticus*, se localizan en el suelo y crecen rápidamente sobre materia orgánica putrefacta. Sus colonias son habitualmente amarillas, verde amarillo, amarillo-marrones, o verdes; granulares, aterciopeladas, o algodonosas; y tienen una saliente periférica blanca y un margen distintivo. (Soriano del Castillo, 2011).

Las condiciones óptimas de crecimiento para *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* son:

1. Temperatura: crecen de 10 a 43°C con una temperatura óptima de 32 a 33°C.
2. Actividad acuosa: crecen de manera óptima a una aw de 0,99, estando la aw mínima para su desarrollo entre 0,80 y 0,85
3. pH: 3.5 – 5.5
4. CO₂: 20%

Aspergillus flavus y *A. parasiticus* están estrechamente relacionados y crecen como saprófitos en los residuos vegetales de muchas plantas de cultivo y en el suelo. Se encuentran en todo el mundo, pero principalmente en países con climas tropicales, subtropicales y templados. (Soriano del Castillo, 2011).

1.2.2 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS AFLATOXINAS

La estructura básica de las Aflatoxinas contiene en su molécula una mitad dihidrodifurano o tetrahidrodifurano unido a un anillo cumarina.

La AFB₁ al igual que la AFG₁, son el resultado del metabolismo de los hongos micotoxigénicos; su estructura química está constituida por la fusión de un núcleo cumarínico y otro bifurano a los que se añaden una ciclo pentanona en el caso de la AFB₁ y un anillo ciclohexanoico en la AFG₁. Las AFB₂ y AFG₂ se obtienen a partir de las AFB₁ y AFG₁, respectivamente, en medios muy ácidos. Las AFM₁ y AFM₂ son metabolitos oxidativos de las AFB₁ y AFB₂, son derivado 4-hidroxilados de la AFB₁ y AFB₂ respectivamente. (Figura 1.1) (Carmean Fernández & Repetto Jiménez, 2012) (Carvajal, 2013).

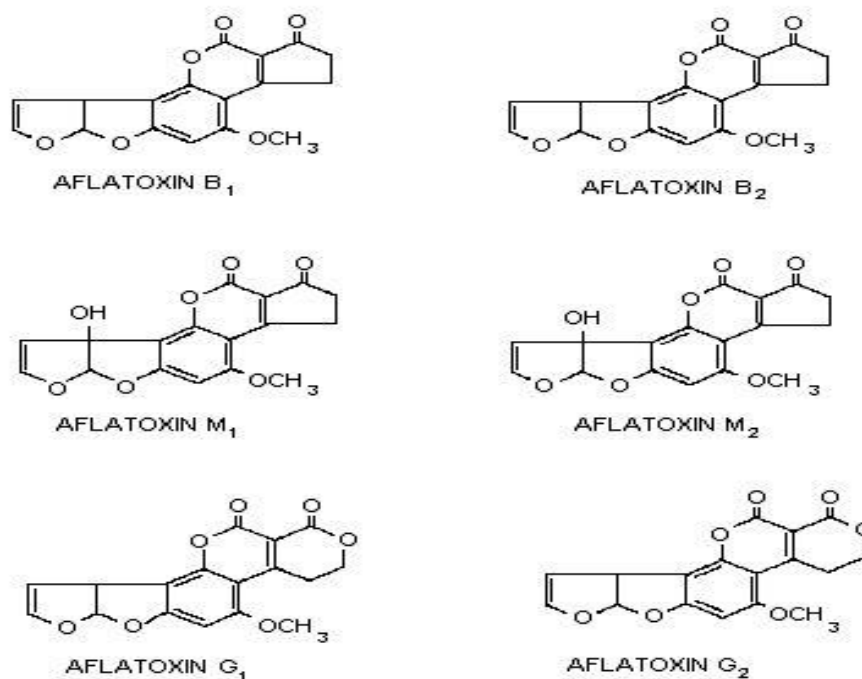


Figura1. 1: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS PRINCIPALES AFLATOXINAS

FUENTE: (Cameán 2012)

1.3 FACTORES QUE AFECTAN AL DESARROLLO FÚNGICO Y A LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS

La producción de micotoxinas depende no solo del genotipo de la cepa fúngica sino también de factores ambientales e incluso de los sustratos en los que las cepas crecen o son aisladas.

Un 40% de los aislamientos de las cepas de *Aspegillus flavus* son aflatoxígenicos, pero depende de las condiciones geográficas y estacionales. Por el contrario, en especies de *A. parasiticus* el porcentaje en la alcanza en la mayoría de las veces el 100%. (Soriano del Castillo, 2011).

Existen agentes físicos y químicos que conducen a la presencia de micotoxinas en los alimentos:

1.3.1 Agentes físicos

Temperatura: Las aflatoxinas se producen a una temperatura óptima de 25°C. El nivel más alto de aflatoxinas producidas por *A. Flavus* en caldo de cultivo se ha observado a 25-30°C tras dos semanas de incubación. (Gimeno, 2013).

Actividad Acuosa (aw): La actividad acuosa se refiere a la cantidad de agua libre disponible para la proliferación de los microorganismos y capaz de reaccionar químicamente con otras sustancias. (Gimeno & Martins, 2011).

Las aflatoxinas se producen con una actividad acuosa con un intervalo de 0,95-0,99, sin embargo su producción puede darse con un mínimo de 0,82 para *A. flavus*. (Soriano del Castillo, 2011).

Humedad relativa de equilibrio (HRE): se refiere a la cantidad de humedad de la que disponen los microorganismos una vez alcanzado el equilibrio entre la humedad del producto y el vapor de agua existente en el medio ambiente que lo rodea. La HRE es expresada en porcentaje y cambia según la composición de los alimentos. (García, 2008).

Descenso de la presión parcial de oxígeno: El descenso de la presión parcial de oxígeno y especialmente el incremento del nivel de CO₂ reducen el desarrollo de los hongos y su capacidad de producir toxinas. (García, 2008).

1.3.2 Factores Químicos

pH: Los hongos son capaces de crecer en un intervalo de pH amplio entre 3 y 8, aunque normalmente tienen su óptimo cercano a 5, soportando mejor el medio ácido que el alcalino. Cabe destacar que los mismos pueden alterar el pH al utilizar la energía de los ácidos orgánicos presentes en el alimento o los eliminados por bacterias acidificantes que aparecen en la descomposición del alimento. (Gimeno & Martins, 2011). (Soriano del Castillo, 2011)

Composición del sustrato: Para la producción de micotoxinas se requieren de sustratos basados en carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos como glicina, glutamato, aspartato, prolina y alanina. La glucosa, fructosa y sacarosa son apropiados en la producción de aflatoxinas cuando se emplea *A. flavus*, mientras que la manosa y xilosa se utilizan con éxito con *A. Parasiticus*.

El zinc, el cobre y el hierro constituyen los principales minerales en la producción de micotoxinas. (Gimeno & Martins, 2011) (Martínez, 2011).

Zonas de microflora: Son pequeñas zonas del alimento con alto contenido en humedad, lo que contribuye a la producción de micotoxinas. (Gimeno & Martins, 2011).

Integridad Física del Alimento: Como los hongos proliferan en mayor cantidad en cereales y forrajes recolectados, se produce un desarrollo más próspero cuando los granos están fraccionados porque el hongo tiene mayor contacto con la superficie interna que es más vulnerable (Gimeno & Martins, 2011).

1.4. AFLATOXINA M₁

La aflatoxina M₁ (AFM₁) es el derivado 4-hidroxi de la AFB₁, es excretada en la leche de las hembras de mamíferos que consumen AFB₁ en la dieta, la cantidad de AFM₁ que llega a la leche suele ser 1 -2% de la cantidad de AFB₁ que ingirió el animal. Tanto la AFB₁ como la AFM₁ son compuestos hepatotóxicos y carcinogénicos y sus efectos sobre la salud pública constituyen una permanente preocupación. (ELIKA, Aflatoxinas, 2013) (Carmean Fernández & Repetto Jiménez, 2012).

La AFM₁ es clasificada por la Agencia Internacional de Investigaciones del Cáncer (IARC) como clase 2B, posible carcinógeno en humanos. Se encuentra en la leche y en los derivados lácteos procedentes de animales que hayan ingerido alimentos contaminados con AFB₁; razón por la que la Unión Europea estableció límites tanto para la AFB₁ en alimentos (5-20 µg/L), como para la AFM₁ (0,05 µg/L) en leche cruda, leche para la fabricación de productos lácteos y leche tratada térmicamente. (Ortiz C. , 2009) (Méndez-Albores & Moreno-Martínez, 2009). (IARC International Agency for Research on Cancer, 2010).

1.5 TOXICIDAD.

Las Aflatoxinas son micotoxinas muy potentes; conocidas por su carcinogenicidad y citotoxicidad, pueden producir dos tipos de intoxicación:

Intoxicación aguda: Se manifiesta por vómito, dolor abdominal, edema pulmonar, infiltración grasa y necrosis del hígado.

Intoxicación crónica: La más importante es la AFB₁ que es ante todo un potente carcinogénico.

El daño hepático se ha demostrado por cambios clínicos y químicos de las funciones hepáticas y cambios histopatológicos, lesión de los conductos biliares, degeneración hepatocelular, necrosis y fibrosis. La toxicidad aguda de la AFM₁ parece similar o ligeramente inferior a la de la AFB₁. (Saa Cruz, 2013).

El mayor riesgo de las aflatoxinas para el hombre es su exposición crónica en la dieta, que se relaciona con un gran número de enfermedades, considerables latentes en países en vías de desarrollo, tales como: hepatitis aguda, los síndromes de Reye y de Kwashiorkor especialmente en niños de los trópicos; el cuadro clínico incluye hígado graso y edema cerebral severo; a largo plazo se presentan efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, estrogénicos, inmunotóxicos, nefrotóxicos y neurotóxicos. (Saa Cruz, 2013).

1.6. ESTABILIDAD DE LA AFM₁; PREVENCIÓN Y DETOXIFICACIÓN.

Para la estabilidad de la leche se utilizan diferentes procesos de pasteurización: baja a 64°C durante 20 minutos, pasteurización media a 64°C a 100°C durante 15-20 minutos, estos dos tipos de pasteurización no son efectivos en cuanto a la reducción de la concentración de AFM₁, sin embargo el proceso de pasteurización alta de 71-120°C durante 30 minutos, se han conseguido reducciones de 12-35% de esta micotoxina. (Gimeno & Martins, 2011)

Con la utilización de nueva tecnología como pasteurización, UHT (132 a 150°C durante 6 a 12 segundos), y UHTST (150°C durante 1 a 2 segundos), aun se han podido encontrar contaminación por aflatoxinas.

Los tratamientos térmicos que pueden aplicarse a una materia prima o a un alimento compuesto no resultan ser muy eficaces, ya que las AFB₁ son resistente a temperaturas del orden de los 120°C. Aunque en los sistemas de la temperatura que se aplica en

algunos casos resulta ser superior a 120°C, el tiempo que dura este tratamiento a dicha temperatura es corto e insuficiente para que se produzca una reducción significativa de AFB₁. (Gimeno & Martins, 2011).

La mejor manera de prevenir la contaminación con AFM₁ es evitar la suministración de raciones de alimento contaminado con AFB₁. (Gimeno & Martins, 2011).

El uso de fungistáticos eficaces y de amplio espectro, inhibe el desarrollo y proliferación fúngica, actuando sobre el hongo pero no sobre la micotoxina que ya está formada, pero si se evitara que se forme más micotoxina. Pero se debe tener en cuenta que el uso inadecuado de los fungistáticos en concentraciones inhibitorias puede ocasionar en algunos casos que éstos sean metabolizados por el hongo, favoreciendo su producción. (Gimeno & Martins, 2011).

Con respecto a la detoxificación se usan aditivos quimi- adsorbentes (arcillas, arcillas filosilicatos-HSCAS y glucomananos esterificados). Estos aditivos deben ser capaces dentro del animal de formar complejos con grupos beta-lactona y alfa-bislactona contenidos en las moléculas de aflatoxinas, que luego serán excretados por las heces reduciendo de forma significativa la transformación de AFB₁ a AFM₁. (Gimeno & Martins, 2011).

1.7. COMPOSICIÓN DE LA LECHE

La leche es uno de los productos alimenticios más antiguos y al mismo tiempo es considerada uno de los alimentos más importantes debido a su aporte nutricional. En la composición de la leche influyen ciertos factores que derivan de la vaca como: raza, edad de la vaca lechera, método de ordeño, estado de salud, alimentación y clima. (Revelo Portilla, 2012).

La definición de leche puede ser considerada de acuerdo a tres aspectos: orgánico, legal y físico-químico:

- **Biológico:** Es una sustancia segregada por la hembra de los mamíferos con el propósito de alimentar al crío.
- **Legal:** Producto de la ordeña de un hato sano y que no representa un peligro para el consumo humano. (Revelo Portilla, 2012).

• **Fisicoquímico:** la leche es una mezcla homogénea de un gran número de sustancias (lactosa, glicéridos, proteínas, sales, vitaminas, enzimas, etc.), que se encuentran unas en emulsión (la grasa y sustancias asociadas), algunas en suspensión (caseínas ligadas a sales minerales) y otras en disolución verdadera (lactosa, vitaminas hidrosolubles, proteínas del suero, sales, etc.) (Revelo Portilla, 2012).

1.7.1. Características físicas de la leche

Sabor: la leche tiene un sabor ligeramente dulce debido principalmente a su alto contenido en lactosa, absorbe los sabores procedentes de los alimentos, del medio ambiente y los utensilios. También es posible que algunos sabores sean derivados de la misma leche como sucede con el sabor rancio y el olor a jabón, ambos producidos por la hidrólisis de la grasa. (Rigaux, 2008)

Olor: la leche tiene un olor ligero, pero este es menos apreciable si el establo y el ganado están muy limpio.

Color: La leche tiene un color ligeramente blanco amarillento que varía de acuerdo a la alimentación del ganado y al contenido de grasa este se debe a la dispersión de la luz por las micelas de fosfocaseinato de calcio.

De la misma forma, el color de la leche cambia según el proceso al que haya sido sometida, así por ejemplo la pasteurización intensifica su blancura y opacidad, la esterilización cambia el color a café claro y el descremado deja la leche de color blanco azulado. (Rigaux, 2008).

Para efectos de este proyecto se considerará a la leche desde estos tres puntos de vista:

Leche cruda: Se define como el producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños diarios, higiénicos, completos e ininterrumpidos, sin ningún tipo de adición o extracción, destinada a un tratamiento posterior previo a su consumo. (INEN NTE 9, 2012).

Leche pasteurizada: Esta denominación aplica para la leche cruda homogenizada o no, que ha sido sometida a un proceso térmico que garantice la destrucción total de los microorganismos patógenos y la casi totalidad de los microorganismos banales

(saprofitos) sin alterar sensiblemente las características fisicoquímicas, nutricionales y organolépticas de la misma.

Las condiciones mínimas de pasteurización son aquellas que producen efectos bactericidas equivalentes a las producidas por las combinaciones de tiempo-temperatura siguientes: 72°C durante 15 segundos (pasteurización de flujo continuo) o 62°C - 65°C durante 30 minutos (pasteurización en lotes). (INEN NTE 10, 2012).

Leche modificada larga vida: Es la leche que ha sido reducida total o parcialmente de alguno de sus componentes naturales o modificada en cualquiera de sus elementos constitutivos, sometida posteriormente a los procesos de esterilización o UHT. (INEN NTE 701, 2009).

1.8. DISPOSICIONES GENERALES PARA LECHE CRUDA, PASTEURIZADA Y LARGA VIDA SEGÚN LA NORMATIVA INEN

Las leches cruda, pasteurizada y larga vida deben cumplir con requisitos físicos y químicos de acuerdo con las normas de ensayo correspondiente (INEN NTE 9-10: 2012) (INEN NTE 701: 2009) que se indican a continuación:

Tabla1.1: REQUISITOS FÍSICO-QUÍMICOS DE LA LECHE CRUDA-PASTEURIZADA Y LARGAVIDA.

REQUISITOS FÍSICOS-QUÍMICOS DE LA LECHE-CRUDA PASTEURIZADA Y LARGA VIDA SEGÚN LA NORMATIVA INEN												
	LECHE CRUDA				LECHE PASTEURIZADA entera				LECHE LARGA VIDA DESCREMADA			
REQUISITOS	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	METODO DE ENSAYO	UNIDAD	MINIMO	MAXIMO	METODO DE ENSAYO	UNIDAD	MINIMO	MAXIMO	METODO DE ENSAYO
Densidad relativa: a 15 °C	----	1,029	1,033	NTE INEN 11		1,029	1,033	NTE INEN 11		1,028	1,031	NTE INEN 11
						1,028	1,032			1,029	1,032	
A 20 °C	-----	1,028	1,032									
Materia grasa	% (fracción de masa)	3,0	-	NTE INEN 12	%(fracción de masa)	3	----	NTE INEN 12	%m/m	-----	< 1,0	NTE INEN 12
Acidez titulable como ácido láctico	% (fracción de masa)	0,13	0,17	NTE INEN 13	%(fracción de masa)	0,13	0,18	NTE INEN 13	%m/v	0,13	0,16	NTE INEN 13
Sólidos totales	% (fracción de masa)	11,2	-	NTE INEN 14	%(fracción de masa)	11,3	-----	NTE INEN 14	%m/m	11,3		NTE INEN 14
Sólidos no grasos	% (fracción de masa)	8,2	-	-	%(fracción de masa)	8,3	---	----	%m/m	8,3		
Cenizas	% (fracción de masa)	0,65	-	NTE INEN 14	%(fracción de masa)	0,65	0,8	NTE INEN 1	%m/m	0,65	0,8	NTE INEN 14
Punto de congelación.	°C	-0,536	-0,512	NTE INEN 15	°C	-0.536	-0.512	NTE INEN 15	°C	-0,54	-0,512	NTE INEN 15
	°H	-0,555	-0,530		°H	-0.555	-0.530		°H	-0,56	-0,530	
Proteínas	% (fracción de masa)	2,9	-	NTE INEN 16	%(fracción de masa)	2,9		NTE INEN 16	%m/m	2,9		NTE INEN 16
Presencia de conservantes1	-	Negativo	-	NTE 1500	---	negativo		NTE 1500	---	negativo		NTE 1500
Presencia de neutralizantes2)	-	Negativo	-	NTE 1500	----	negativo		NTE 1500	----	negativo		NTE 1500
Presencia de adulterantes	-	Negativo	-	NTE 1500	----	negativo		NTE 1500	-----	negativo		NTE 1500
Grasas vegetales	-	Negativo	-	NTE 1500	----	negativo		NTE 1500	----	negativo		NTE 1500
Suero de Leche	-	Negativo	-	NTE 2401	----	negativo		NTE 1500	----	negativo		NTE 1500
Residuos de medicamento veterinario	ug/l	negativo		NTE 1500	ug/l	negativo		NTE 1500	--	---	---	----

FUENTE: (INEN NTE 9-10:2012) (INEN NTE 701: 200

1.9. LÍMITES DE AFM₁ EN LECHE CRUDA, PASTEURIZADA Y ULTRAPASTEURIZADA SEGÚN LA NORMATIVA INEN Y LA NORMATIVA INTERNACIONAL FDA.

La normativa INEN y la normativa FDA especifican valores máximos de la concentración de AFM₁ en la leche los cuales se indican en la siguiente tabla:

Tabla 1.2: LÍMITE MÁXIMO DE AFM₁ PARA LA LECHE CRUDA-PASTEURIZADA.

REQUISITO	LECHE CRUDA	LECHE PASTEURIZADA	LECHE ULTRAPASTEURIZADA
AFM ₁ (ug/L)	Límite máximo (LM)	Límite máximo (LM)	Límite máximo (LM)
	0,5	0,5	0,5

FUENTE: (INEN NTE 9-10: 2012) (INEN NTE 701: 2009) (FDA, 2015)

METODOLOGÍA

II

2.1 TIPO DE ESTUDIO Y DISEÑO.

El presente estudio es una investigación experimental en la que se aplica el método científico descriptivo analítico, de acuerdo a su direccionalidad es un diseño cuantitativo, con una variable independiente la concentración de aflatoxina M_1 y como variable dependiente la presencia del metabolito toxico.

Este trabajo de tesis fue basado en un estudio realizado en Ecuador en donde se aplicó la técnica de Elisa razón por la cual se consideró el mismo tipo de investigación, población y muestreo.

Debido que es el único estudio realizado en el país se quiso comprobar por una técnica de mayor sensibilidad como es la de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

2.2 DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

El estudio fue realizado en el laboratorio de Alimentos y Nutrición del Proyecto VLIR-IUC “Alimentación, Nutrición y Salud” de la Universidad de Cuenca en el mes de octubre de 2015.

2.2.1 Población, muestra y muestreo

2.2.1.1 Población

El estudio se realizó seleccionando como puntos de muestreo tres supermercados de la ciudad de Cuenca de mayor afluencia (Coralcentro Coralrio y Supermaxi) y la Hacienda Santa Cecilia de la parroquia Tarqui.

2.2.1.2 Tamaño de la muestra y muestreo.

Se recolectaron un total de 84 muestras de forma aleatoria estratificada. Un muestreo aleatorio estratificado es aquel en el que se divide la población en subpoblaciones, atendiendo a criterios que puedan ser importantes en el estudio.

Se ejecutaron dos muestreos el primero se realizó en el mes de julio de 2015 y el segundo en el mes de septiembre del mismo año. En cada muestreo se recolectaron 42 muestras: 2 de leche cruda, 4 de pasteurizada y 36 de ultrapasteurizada.

Para el muestreo se examinaron tres tipos de leche según el tratamiento térmico y el contenido de grasa; los tipos de muestras analizadas proceden de tres marcas distintas a nivel comercial, como se detalla en la tabla 2.1.

Tabla 2.1: MUESTRAS DE LECHE RECOLECTADAS PARA EL ANALISIS.

MARCAS	TIPOS DE LECHE (contenido graso)	TIPOS DE TRATAMIENTO	LUGAR DE RECOLECCION		No. TOTAL DE MUESTRAS
NUTRI LECHE	DESCREMADA	UHT	SUPERMERCADO	SUPERMAXI CORALRIO CORALCENTRO	12
LA LECHERA	SEMIDESCREMADA	UHT	SUPERMERCADO	SUPERMAXI CORALRIO CORALCENTRO	12
PARMALAT	DESCREMADA	UHT	SUPERMERCADO	SUPERMAXI CORALRIO CORALCENTRO	12
TONI	ENTERA	UHT	SUPERMERCADO	SUPERMAXI CORALRIO CORALCENTRO	4
LECHE CRUDA	ENTERA		HACIENDA SANTA CECILIA		4
NUTRI LECHE	ENTERA	PASTEURIZADA	SUPERMERCADO	SUPERMAXI CORALRIO CORALCENTRO	4
LA LECHERA	ENTERA	UHT	SUPERMERCADO	SUPERMAXI CORALRIO CORALCENTRO	12
PARMALAT	ENTERA	UHT	SUPERMERCADO	SUPERMAXI CORALRIO CORALCENTRO	12
NUTRI LECHE	ENTERA	UHT	SUPERMERCADO	SUPERMAXI CORALRIO CORALCENTRO	12

FUENTE: (Elaborado por autores)

2.3 ANÁLISIS DE AFM₁

2.3.1. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS AFM₁.

El análisis se realizó el mes de octubre del 2015 en el laboratorio de Alimentos y Nutrición del Proyecto VLIR-IUC “Alimentación, Nutrición y Salud” de la Universidad de Cuenca. Para la cuantificación de aflatoxinas se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para lo cual se emplearon los siguientes equipos, materiales y reactivos que se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 2.1: REACTIVOS REQUERIDOS PARA EL ANALISIS DE AFM₁ POR HPLC

EQUIPOS	MATERIALES	REACTIVOS
Centrifuga Marca: HETTICH Modelo: MIKRO22OR Procedencia: Alemania	Tubos cónicos de 15 y 50 ml	Estándar estándar de Aflatoxina M ₁ 10 µg/mL en acetonitrilo
Baño María Marca: memmert Modelo: WNB10	Gradillas para los tubos falcón	Columnas de inmunoafinidad (EASI EXTRACT®Aflatoxin) Marca: R- BIOPHARM Procedencia: Alemania
Manifold Marca: WATERS Procedencia: Estados unidos	Pipetas de 10 ml	Acetonitrilo grado HPLC Marca: MERCK Procedencia: Estados Unidos
HPLC con detector de fluorescencia Marca: Agilent Modelo: 1200 Procedencia: Estados Unidos	Micropipetas de 10-100 ml y 100-1000ml	Metanol grado HPLC Marca: SIGMA ALORICH Procedencia: Estados Unidos
Baño ultrasónico Marca: Branson Modelo: 3510R-DTH Procedencia: Estados Unidos	Pipetas Pasteur	Ácido Acético Glacial Marca: MERCK Procedencia: Alemania
Homogeneizador horizontal Marca: VWR SHAKER Modelo: 3500ADV Procedencia: Estados Unidos	Embudos de vidrio	Agua grado HPLC
Generador de N ₂ Marca: DOMINICK Modelo: G4510W Procedencia: Estados Unidos	Papel filtro (Whatman N°4)	PBS (Solución de fosfato de buffer salino) Marca: SIGMA ALORICH Procedencia: Estados Unidos
Purificador de agua Marca: BARNSTEAD Modelo: 3500ADV Procedencia: Estados Unidos	Probeta 250ml	
	Vasos de precipitación (50ml)	
	Papel aluminio	

FUENTE: (Astudillo, 2013)

2.3.2 FUNDAMENTO DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar y una fase móvil que actúa como portador de la muestra. Los componentes de la mezcla interaccionan de distinta forma con la fase estacionaria y con la fase móvil. De esta manera, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando. Posteriormente pasan a un detector que genera una señal que va depender de la concentración y del tipo de compuesto. (Chalco, 2014)

2.3.2.1 CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Para este estudio se utilizó un cromatógrafo de alta resolución marca Agilent Technologies Serie 1200 (Figura 2.1) el cual consta de los siguientes elementos:

- Bomba cuaternaria, adecuada para el volumen de flujo constante de aproximadamente 1 ml/min.
- Sistema inyector, con volumen de inyección de circuito adecuado para la inyección de 0.1 μ l a 900 μ l.
- Detector de fluorescencia. Emisión de 280 a 900 nm y Excitación de 200 a 700 nm.
- Columna Cromatográfica Agilent ZORBAX C18 de fase reversa de 4,6 mm X 250 mm, tamaño de partícula 5 μ m con envase de octadecyl- silica gel.
- Unidad de control del equipo y tratamiento de los datos con el programa software Agilent Chemstation for LC and LC/MC systems (LCI200 online, LCI200 offline). (Astudillo, 2013)



Figura. 2.1 Equipo de cromatografía de alta resolución HPLC.

2.3.3. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS EN HPLC PARA EL ANALISIS DE AFLATOXINA M₁.

- Columna: Agilent HPLC column; Zorbax Eclipse Plus C18 (4.6 x 250 mm, 5 μ m).
- Flujo 0.8ml/ min.
- Detector de fluorescencia: Excitación 365nm. Emisión 450nm.
- Temperatura de la columna: 35°C.
- Volumen de inyección de la muestra: 20 μ l.
- Fase Móvil: 2% ácido acético: acetonitrilo: metanol (40:35:25 v/v).

Límite de detección (LD):

Se define como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. Un factor que afecta directamente a la exactitud y la precisión de un análisis es el ruido. (Ballesteros, 2013). Un parámetro que se utiliza para certificar la calidad de un método analítico es la relación señal/ruido (S/N), siendo S la señal correspondiente al compuesto objeto de estudio Y N la señal del ruido de fondo. Este valor se consigue multiplicando 3 veces la señal

sobre el ruido a partir de los datos de estimación lineal de las áreas y concentraciones de la matriz de base.

Límite de cuantificación (LQ):

Es la menor cantidad de analito de la muestra que puede ser medida cuantitativamente con una certeza estadística razonable. (Ballesteros, 2013)

Porcentaje de recuperación.

La recuperación significa el porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperada durante un procedimiento analítico. La determinación del grado de recuperación para AFM₁ se realizó mediante la contaminación de muestras de leche analizadas que presentaron menor concentración de dicha micotoxina. La concentración de la muestra contaminada fue calculada por interpolación del área bajo la curva (respuesta del HPLC) en la curva de calibración respectiva. Esta concentración fue comparada con la concentración inicial adicionada a la muestra de leche pura y expresada como porcentaje. (Ballesteros, 2013)

Tiempo de retención

Es el tiempo transcurrido entre el instante en que se inyecta la muestra en el cromatógrafo hasta que el pico correspondiente a cada compuesto eluido alcance su altura máxima. (Ballesteros, 2013)

2.3.4 TÉCNICA PARA LA EXTRACCIÓN DE AFM₁

La AFM₁ es extraída y limpiada al pasar la muestra a través de una columna de inmunoafinidad (IAC). La columna contiene anticuerpos monoclonales específicos unidos covalentemente a un material de soporte sólido. A medida que la muestra pasa a través de la columna, los anticuerpos se unen selectivamente con cualquier AFM₁ (antígeno) contenida en la muestra, para dar un complejo anticuerpo-antígeno.

La columna es lavada y la toxina unida es liberada por el anticuerpo después de la elución de la columna con metanol/acetonitrilo.

2.4. PROCEDIMIENTO

2.4.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Almacenar las muestras de leche en refrigeración a una temperatura de 10°C hasta el análisis.
2. Atemperar las muestras a temperatura ambiente 12 horas antes de su análisis, rotular las muestras.
3. Medir 20 ml de muestra de leche.
4. Llevar a baño maría a 37°C durante 10 minutos.
5. Centrifugar a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
6. Remover la capa de grasa.
7. Filtrar a través de un papel filtro Whatman N°4.
8. Recolectar la muestra en tubos cónicos de 50 ml. Medir el volumen final.

2.4.2. CLEAN UP

1. Temperar las columnas de inmutoafinidad a temperatura ambiente y acondicionarlas con 3ml de la solución salina de fosfato (PBS) prelavado.
2. Pasar la muestra lentamente a través de la columna en un flujo de 2-3 ml/min. Una presión constante lenta es esencial para la captura de la toxina por el anticuerpo. Evitar dejar secar.
3. Lavar la columna haciendo pasar 10 ml de tampón fosfato salino (PBS) a través de la columna a una velocidad de flujo de aproximadamente 5 ml por minuto.
4. Colocar 10 ml de agua de HPLC a través de la columna a una velocidad de flujo de aproximadamente 5 ml por minuto.

ELUCIÓN

5. Añadir 1,5 ml de metanol: acetonitrilo MeOH: ACN (2:3 v/v). Lentamente pasarlo a través de la columna a una velocidad de flujo de aproximadamente 2 – 3 ml/min.
 - **Nota:** Para asegurar la eliminación completa de la toxina unida del anticuerpo es recomendable que la solución acetonitrilo: metanol se deje en contacto con la columna por 30 segundos durante el proceso de elución. Luego se procede a realizar el backflushing tres veces.

6. Pasar 1 ml de agua de HPLC a través de la columna y recolectar el eluido final con un volumen de 2,5 ml en un tubo cónico. (15ml).
7. Una vez obtenido el eluido se cubre el tubo con papel aluminio para protegerlo de la luz.

2.5 Preparación de Estándares de AFM₁ para curva de calibración en HPLC.

Soluciones estándar de Aflatoxina M₁ (Supelco) (10 µg/ml en acetonitrilo). Se transfieren 500 µl de solución estándar madre (10 µg/ml en acetonitrilo) a un balón aforado y completar a 10 ml de acetonitrilo puro (dilución 1/20). Se transfieren alícuotas de 200 µl a microtubos, se secan bajo una corriente de nitrógeno y se almacenan en el congelador (-20°C). La reconstitución del estándar seco se realiza con la adición de 1ml de acetonitrilo/agua (1:1), obteniendo una concentración de 100 µg/L.

2.6 ANÁLISIS DE DATOS

Se realizó una curva de calibración con los siguientes patrones de aflatoxinas 0,1 0,2 0,5, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75 ug/ml partiendo de un estándar madre de **Aflatoxina M₁ 10 µg/mL** en acetonitrilo ya que la concentración de AFM₁ en la leche será estimada por medio de una curva de calibración.

Para el análisis del nivel de contaminación de la leche cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada con AFM₁ utilizamos la siguiente ecuación:

$$C \text{ (ng/ml)} = \frac{C_1 \text{ (ng/ml)}}{V \text{ (ml)}}$$

C= concentración de AFM₁ que se encuentra en la muestra analizada.

C₁ = concentración de AFM₁ que se encuentra en la alícuota inyectada. Se obtiene por interpolación de la curva de calibración.

V = volumen de la muestra para la inyección.

Para calcular el volumen de muestra que se encuentra en la alícuota inyectada nos basamos en lo siguiente:

Volumen inicial de la muestras= 20 ml

Volumen final después de la extracción = 2,5 ml

Se hace una relación de $20/2,5 = 8$ ml que es el volumen de la muestra inyectada, mismo que se utilizara para los respectivos cálculos.

2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico establecido para este estudio comprendió un test descriptivo y un test comparativo para medias; pero debido a que se obtuvo solo dos muestras por encima del límite de cuantificación (0,18ug/L), por lo que no fue posible realizar estos dos tipos de análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se analizó un total de 84 muestras de leche provenientes de tres supermercados y de la Hacienda Santa Cecilia de la parroquia Tarqui. (Tabla 3.1).

Para cada muestra se recolectaron los siguientes datos: marca de leche (Nutri leche, La Lechera, Toni, Parmalat), tipo de leche según el contenido graso (descremada, semidescremada, entera), tipo de tratamiento térmico (UHT, pasteurizada), sin tratamiento térmico (leche cruda), número de muestras seleccionadas, números de lote y lugar de recolección. (Tabla 3.2)

TABLA 3.1. PORCENTAJE Y NÚMERO TOTAL DE MUESTRAS DE LECHE ANALIZADAS DE TRES SUPERMERCADOS DE LA CIUDAD DE CUENCA Y DE LA HACIENDA SANTA CECILIA DE LA PARROQUIA TARQUI.

SUPERMERCADO	MUESTRAS	PORCENTAJES
CORAL CENTRO	42	50%
CORAL RIO	21	25%
SUPERMAXI	17	21%
Hacienda Santa Cecilia	4	4%

FUENTE: Elaborado por autores



MARCAS	TIPOS DE LECHE (contenido graso)	TIPOS DE TRATAMIENTO	LUGAR DE RECOLECCION		No. TOTAL DE MUESTRAS	FECHA DEL MUESTREO		NUMERO DE LOTE
NUTRI LECHE	DESCREMADA	UHT	SUPERMERCADO:	SUPERMAXI CORALRIO CORALCENTRO	12	MUESTREO No. 1	04/07/2015 18/07/2015	L50603E (3) L50514E (3)
						MUESTREO No. 2	04/09/2015 18/09/2015	L50915E (3) L50828E (3)
LA LECHERA	SEMIDESCREMADA	UHT	SUPERMERCADO:	SUPERMAXI CORALRIO CORALCENTRO	12	MUESTREO No. 1	04/07/2015 18/07/2015	L51920682JB (3) L52040682JA (3)
						MUESTREO No. 2	04/09/2015 18/09/2015	L52310682jb(3) L52930682JA (3)
PARMALAT	DESCREMADA	UHT	SUPERMERCADO:	SUPERMAXI CORALRIO CORALCENTRO	12	MUESTREO No. 1	04/07/2015 18/07/2015	148 (3) 2698 BCL (3)
						MUESTREO No. 2	04/09/2015 18/09/2015	2808 AWC (3) 2758ACB (3)
TONI	ENTERA	UHT	SUPERMERCADO:	SUPERMAXI CORALRIO CORALCENTRO	4	MUESTREO No. 1	04/07/2015 18/07/2015	L6792 (1) L6820 (1)
						MUESTREO No. 2	04/09/2015 18/09/2015	L6786(1) L6876(1)
LECHE CRUDA	ENTERA			HACIENDA SANTA CECILIA	4	MUESTREO No. 1	17/10/2015 18/10/2015	
						MUESTREO No. 2	17/10/2015 18/10/2015	
NUTRI LECHE	ENTERA	PASTEURIZADA	SUPERMERCADO:	SUPERMAXI CORALRIO CORALCENTRO	4	MUESTREO No. 1	15/10/2015 16/10/2015	L52012M3 (1) L51017MH3 (1)
						MUESTREO No. 2	17/10/2015 18/10/2015	L51013M3 (1) L51006MH3 (1)
LA LECHERA	ENTERA	UHT	SUPERMERCADO:	SUPERMAXI CORALRIO CORALCENTRO	12	MUESTREO No. 1	04/07/2015 18/07/2015	L51480682DA (3) L52530682HA (3)
						MUESTREO No. 2	04/09/2015 18/09/2015	L5152067HA (3) L5853068 (3)
PARMALAT	ENTERA	UHT	SUPERMERCADO:	SUPERMAXI CORALRIO CORALCENTRO	12	MUESTREO No. 1	04/07/2015 18/07/2015	152 (3) 2668 (3)
						MUESTREO No. 2	04/09/2015 18/09/2015	2785 DVC (3) 2805 DCB (3)
NUTRI LECHE	ENTERA	UHT	SUPERMERCADO:	SUPERMAXI CORALRIO CORALCENTRO	12	MUESTREO No. 1	04/07/2015 18/07/2015	L50902A (3) L50625B (3)
						MUESTREO No. 2	04/09/2015 18/09/2015	L50526A (3) L50916B (3)

Tabla3.2: Muestras de leche recolectadas según marca, tipos, tipo de tratamiento térmico, número de muestras seleccionadas, números de lote y lugar de recolección. FUENTE: Autores

3.2 CURVA DE CALIBRACIÓN

Para determinar la concentración de aflatoxina M₁ se realizó una curva de calibración de diferentes patrones partiendo de una solución madre. (Tabla 3.3).

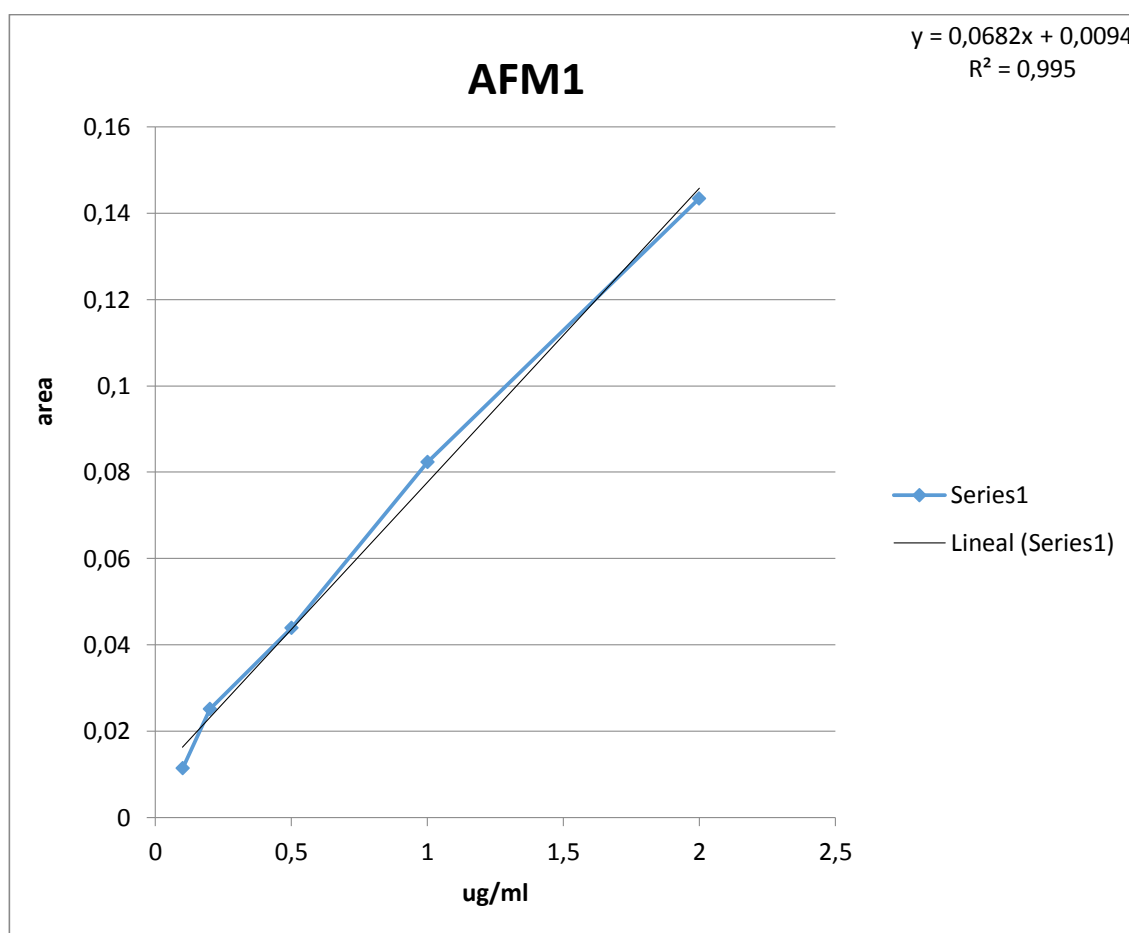
TABLA. 3.3 TABLA DE PATRONES PARA LA ELABORACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE AFM₁

ng/ml	Área	RT
75	5,35754	4,129
50	3,56893	4,139
25	1,72612	4,144
10	0,520714	4,160
5	0,371059	4,129
2	0,143371	4,067
1	0,0823759	4,068
0,5	0,0438855	4,069
0,2	0,0251404	4,062
0,1	0,0114066	4,072

FUENTE: Elaborado por autores

Para la curva de calibración se consideraron los siguientes patrones 0,1, 0,2, 0,5, 1 ,2 ug/ml debido a que los resultados de las concentraciones de AFM₁ están dentro de este rango de patrones.

Figura 3.1. CURVA DE CALIBRACIÓN DE LOS PATRONES PARA LA DETERMINACIÓN DE AFM₁



FUENTE: Elaborado por autores

3.3 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE AFM₁ EN LECHE POR HPLC.

La determinación del grado de contaminación de AFM₁ en las muestras de leche cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada se realizó por HPLC con detector de fluorescencia en fase inversa. De un total de 84 muestras de leche comercializadas en tres supermercados de la ciudad de Cuenca y en la Hacienda Santa Cecilia de la Parroquia Tarqui, 16 muestras resultaron positivas para AFM₁ entre el límite de detección y de cuantificación (0,09 µg/L – 0,18 µg/L) con una prevalencia del 19% (16/84), pero solo en dos muestras fue posible cuantificar la concentración de AFM₁ siendo de 0,18 ug/L en ambas.

En la (tabla 3.4) se indica el número de muestras positivas con respecto al tipo de leche de acuerdo al contenido graso en donde se observa cifras mayores de muestras positivas con respecto a la leche entera; esto puede deberse a que se analizaron mayor número de muestras de este tipo leche.

TABLA. 3.4 RESULTADOS DE AFM₁ SEGÚN EL TIPO DE LECHE.

TIPO DE LECHE (contenido graso)	# MUESTRAS POSITIVAS/ # TOTAL
Entera	8/48
Semidescremada	5/12
Descremada	3/24
TOTAL	16/84

FUENTE: Elaborado por autores

Los valores de AFM₁ cuantificables fueron inferiores a la concentración permitido por la norma INEN NTE 9-10: 2012 (0,5 ug/L) y de la FDA (0,5 ppb), por lo tanto las distintas clases de leche estudiadas en esta investigación podrían considerarse aptas para el consumo humano pues cumplen con las normas establecidas. En investigaciones similares, Pérez y colaboradores en el año 2008 en México empleando la técnica de HPLC en leche cruda, ultrapasteurizada y orgánica observaron mayores prevalencias de hasta 59% y en todos los casos se encontraron valores por encima del límite máximo propuesto por la Unión Europea. En Brasil entre el año 2005-2006 Fernández, Soares & Fagundes utilizando la misma técnica de HPLC determinaron mayores prevalencias de 36,7% en leche cruda pero sólo una muestra presentó valores por encima del límite de tolerancia adoptadas en ese país. Otro estudio utilizando HPLC en el año 2013 realizado por Gutiérrez, Vega & Pérez descubrieron que el 23,3% de las muestras de leche orgánica analizadas superan el límite máximo de residuos propuesto por la regulación mexicana, mientras que el 62,7% están por encima del límite máximo de la Unión Europea.

En Ecuador empleando la técnica de ELISA, Uguña Rosas en el año 2013 concluyó que los valores obtenidos en leche cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada fueron inferiores al valor de la concentración de aflatoxina M₁ permitido por la norma Ecuatoriana INEN y la normativa internacional FDA.

Algunos de estos estudios difieren de nuestro trabajo de tesis ya que presentan valores de AFM₁ que están por encima a los valores establecidos por la Unión Europea y la normativa correspondiente a cada país, con respecto al estudio realizado 16/84 fueron positivas pero no superan los valores establecidos por la normativa ecuatoriana INEN y la normativa internacional FDA.

Los niveles de AFM₁ obtenidos en diferentes estudios muestran amplias diferencias, esto puede deberse a diversos factores como los regímenes de alimentación, raza del animal, producción de leche, condiciones ambientales, entre otros.

CONCLUSIONES

IV

CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se determinó que la prevalencia de las muestras positivas para AFM₁ en la leche cruda, pasteurizada y UHT comercializadas en tres supermercados de la ciudad de Cuenca fue de un 19%, considerando que solo dos muestras se encontraron sobre el límite de cuantificación (>0,18 p.p.b).

En este estudio se planteó como hipótesis encontrar diferencias en la concentración de AFM₁ en la leche cruda, pasteurizada y ultra pasteurizada analizada por técnica de HPLC. Los valores de concentración de AFM₁ en cada tipo de leche superan significativamente los valores de la normativa INEN y FDA (0,5 p.p.b), pero debido a la baja prevalencia (19%) de las concentraciones cuantificadas en las muestras de leche cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada no fue posible la comprobación de la hipótesis, por lo que solamente se presentan los resultados de la determinación de AFM₁.

Conforme a los objetivos planteados con respecto a la cuantificación y comparación de la concentración de AFM₁ se concluye que los niveles de dicha micotoxina encontrados en leche cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada expendidas en la ciudad de Cuenca y analizadas por la Técnica de HPLC están por debajo de los límites establecidos por la normativa nacional INEN NTE 9-10:2012 y la internacional FDA.

RECOMENDACIONES

V

RECOMENDACIONES

Debido a que no existen estudios similares en el país se recomienda realizar investigaciones en otras regiones porque se tienen diferencias climáticas por lo que se podrían encontrar valores superiores de AFM_1 y aplicar las medidas respectivas

Realizar estudios en derivados lácteos como queso, yogurt que son sensibles a la contaminación con micotoxinas, con el fin de confirmar que estos alimentos sean aptos y seguros para los consumidores.

BIBLIOGRAFÍA

VI

BIBLIOGRAFÍA:

1. Astudillo, G. (2013). Determinacion de AFM1 por la tecnica de HPLC. Cuenca, Ecuador. Retrieved noviembre 15, 2015
2. Ballesteros, A. (2013). *Repositorio digital de la Universidad de Cuenca*. Retrieved diciembre 10, 2015, from Evaluacion de la prevalencia de aflatoxina M1 en leche materna y su relacion con la fuente dietaria de aflatoxinas. Caso estudio: Nabon - Ecuador: <http://repository.ut.edu.co/>
3. Carmean Fernández, A., & Repetto Jiménez, M. (2012). *Toxicología Alimentaria*. Díaz de Santos. Retrieved enero 25, 2015
4. Carvajal, M. (2013). Transformacion de la aflatoxina B₁ de alimentos, en el cancerigeno humano, aducto AFB1 - ADN. *Revista Especializada en Ciencias Quimico - Biologicas*. Retrieved febrero 02, 2015
5. Chalco, D. (2014). *Repositorio digital de la Univerdad de Cuenca*. Retrieved diciembre 10, 2015, from Riesgo toxicológico de aflatoxinas presentes en maní y nueces comercializados en los principales mercados de la ciudad de Cuenca.: <http://repository.ut.edu.co/>
6. Combita Prieto, A. d., & Milderberg Ortiz, S. (2009, enero 14). *Repositorio de la Pontificia Universida Javeriana*. Retrieved noviembre 29, 2015, from Detección de aflatoxina M1 en leches frescas comercializadas en la zona del Valle del Cauca (Colombia) mediante la técnica de ELISA.: <http://www.javeriana.edu.co/>
7. ELIKA. (2013). Aflatoxinas. *Agroalimentaria, Fundación Vasca para la Seguridad*, 1- 4. Retrieved marzo 16, 2015, from Aflatoxina B1.
8. FAO. (2009). *Cómite del CODEX sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos*. Retrieved Marzo 2015, from <http://www.fao.org/home/en/>
9. Fernandes, C., Soares, L., & Fagundes, H. (2005 - 2006). Determinación de la aflatoxina B1 en la alimentación animal y la aflatoxina M1 en la leche en las explotaciones lecheras de São Paulo. *Revista científica*. Retrieved noviembre 29, 2015

10. García, D. (2008). *Factores que influyen en la toxicidad de las Aflatoxinas*. Retrieved Marzo 28, 2015, from <http://www.veterinaria.org/>
11. Gimeno, A. (2013, Diciembre). *Micotoxinas*. Retrieved mayo 27, 2015, from Residuos de Aflatoxina M1 en la leche y su impacto en la salud humana: <http://www.engormix.com/>
12. Gimeno, A., & Martins, M. (2011). *Micotoxinas y Micotoxicosis en Humanos*. Miami, Estados Unidos: Special Nutrients INC. Retrieved abril 02, 2015
13. Gutierrez, R., Vega, S., & Perez, J. (2013, enero - abril). Evaluacion de aflatoxina M1 en leche organica producida en Tecpatan, Chiapas, Mexico. *Revista salud*, 35(1). Retrieved noviembre 22, 2015
14. Guzmán, D. (2007). La exposición a la aflatoxina B1 en animales de laboratorio y su significado en la salud pública. *Salud pública de México*, 49(3). Retrieved mayo 25, 2015
15. IARC International Agency for Research on Cancer. (2010). Monographson the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 82 - 171. Retrieved Marzo 26, 2015
16. INEN NTE 10. (2012). Leche Pasteurizada Requisitos. Quinta revisión. Ecuador. Retrieved abril 20, 2015
17. INEN NTE 701. (2009). Leche Larga Vida. Requisitos. Quinta revisión. Ecuador. Retrieved abril 15, 2015
18. INEN NTE 9. (2012). Leche Cruda. Requisitos Quinta Revisión. Ecuador. Retrieved abril 24, 2015
19. Landeros, P., Noa, M., Lopez, Y., & Gonzales, D. (2012). NIVELES DE AFLATOXINA M1 EN LECHE CRUDA Y PASTEURIZADA COMERCIALIZADA EN LA ZONA METROPOLITNA DE GUADALAJARA, MEXICO. *salud*, 34(1). Retrieved noviembre 21, 2015
20. Martínez, C. (2011). *Evaluación de un adsorbente de micotoxinas de nueva generación como aditivo de pienso en animales de renta*. Retrieved Marzo 2015, from <http://www.tdx.cat/>
21. Méndez-Albores, A., & Moreno-Martínez, E. (2009, julio- septiembre). Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos. *Revista Ciencia*, 45 - 57. Retrieved enero 25, 2015
22. Ortiz, C. (2009). Análisis de Aflatoxina M1 en leche fresca de establos lecheros de Arequipa. . *Revista de investigaciones veterinarias del Peru*, 2(1). Retrieved febrero 05, 2015
23. Perez, J., Gutierrez, R., Vega, S., Diaz, G., Urban, G., & Escobar, A. (2008). Ocurrencia de aflatoxina M1 en leches cruda, ultrapasteurizada y orgánica producidas y

- comercializadas en el Altiplano Mexicano. *Revista Salud*, 30(2). Retrieved noviembre 20, 2015
24. Revelo Portilla, R. (2012, Octubre). *Estudio de la factibilidad para la creación de una empresa de lacteos en la provincia del Carchi*. Retrieved Marzo 2015, from <http://repositorio.utn.edu.ec/>
25. Rigaux, E. (2008). *La leche, la manteca y el queso*. Madrid: Maxtor. Retrieved julio 16, 2015
26. Saa Cruz, M. (2013). Intoxicacion alimentaria por micotoxinas. 23 - 39. Cuenca, Ecuador. Retrieved marzo 23, 2015
27. Soriano del Castillo, J. (2011). *Micotoxinas en Alimentos*. España: Díaz Santos. Retrieved marzo 26, 2015
28. Torres, M., Aparicio, J., & García, J. (2014). Aflatoxicosis. *REDVET*, 15(2), 4-5. Retrieved Marzo 2015
29. Uguña Rosas, M. (2013). *Repositorio digital de la Universidad de Cuenca*. Retrieved diciembre 01, 2015, from Determinación del metabolito tóxico de origen fúngico en leche cruda, pasteurizada y ultrapasteurizada consumidas en la ciudad de Cuenca: aflatoxina AFM1 mediante la técnica de ELISA: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/>
30. Valle Vega, P. (2010). *Universidad Nacional Autónoma de México*. Retrieved abril 02, 2015, from Toxicología de Alimentos: <http://uniciencia.ambientalex.info>
31. Vásquez Santa, M. (2010). *Repositorio digital de la Universidad de la salle*. Retrieved enero 26, 2015, from Evaluación de Afaltoxinas en suplementos para vacas lecheras en la Sabana de Bogotá, y su relación con Aflatoxina M1 en leche: <http://repository.lasalle.edu.co/>
32. Zumbado, C., Ulloa , M., & Rojas, G. (2014). Aflatoxina B1 y su relacion con el cáncer hepático. *Revista medica de Costa Rica y Centro America* , LXXI, 637 - 641. Retrieved diciembre 20, 2015

ANEXOS

ANEXO 1. Tabla de determinación del grado de recuperación de AFM₁ en una muestra de leche contaminada con una concentración de 10ng/l de una solución madre de AFM₁, realizado en el laboratorio de Alimentos y Nutrición del Proyecto VLIR-IUC “Alimentación, Nutrición y Salud” de la Universidad de Cuenca.

ANEXO 1. TABLA DE DETERMINACIÓN DEL GRADO DE RECUPERACIÓN

Día	MUESTRA	RT	área	área corregida (leche muestra)	Conc. (x)	conc/spiking	recovery (%)
D1	M1	4,078	0,44898	0,44256	7,046	10	70
D1	M2	4,076	0,42306	0,41653	6,686	10	67
D1	M3	4,079	0,46783	0,46226	7,319	10	73
D2	M1	4,089	0,52006	0,51183	8,005	10	80
D2	M2	4,086	0,30853	0,30485	5,142	10	
D2	M3	4,093	0,38831	0,38165	6,204	10	62
D3	M1	4,120	0,45499	0,44757	7,116	10	71
D3	M2	4,119	0,40226	0,39745	6,423	10	64
	PROMEDIO						70

RT= Tiempo de retención.
Conc. (x)= concentración de la muestra analizada.
conc/spiking= concentración de la solución madre añadida a la muestra
recovery (%)= porcentaje de recuperación.

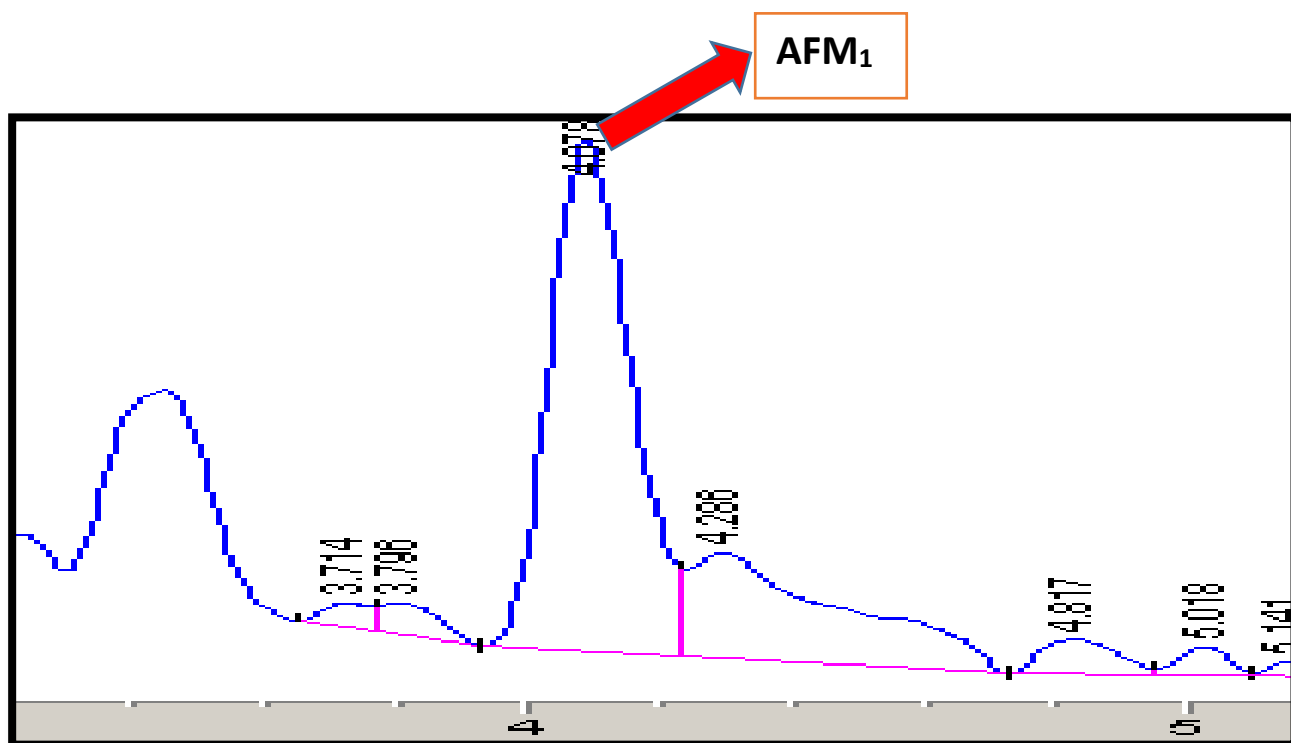
FUENTE:(Elaborado por autores)

**ANEXO 2. TABLA DE RESULTADO DE LAS 16 MUESTRAS QUE SE
ENCUENTRAN ENTRE EL LIMITE DE DETECCIÓN Y LIMITE DE
CUANTIFICACIÓN.**

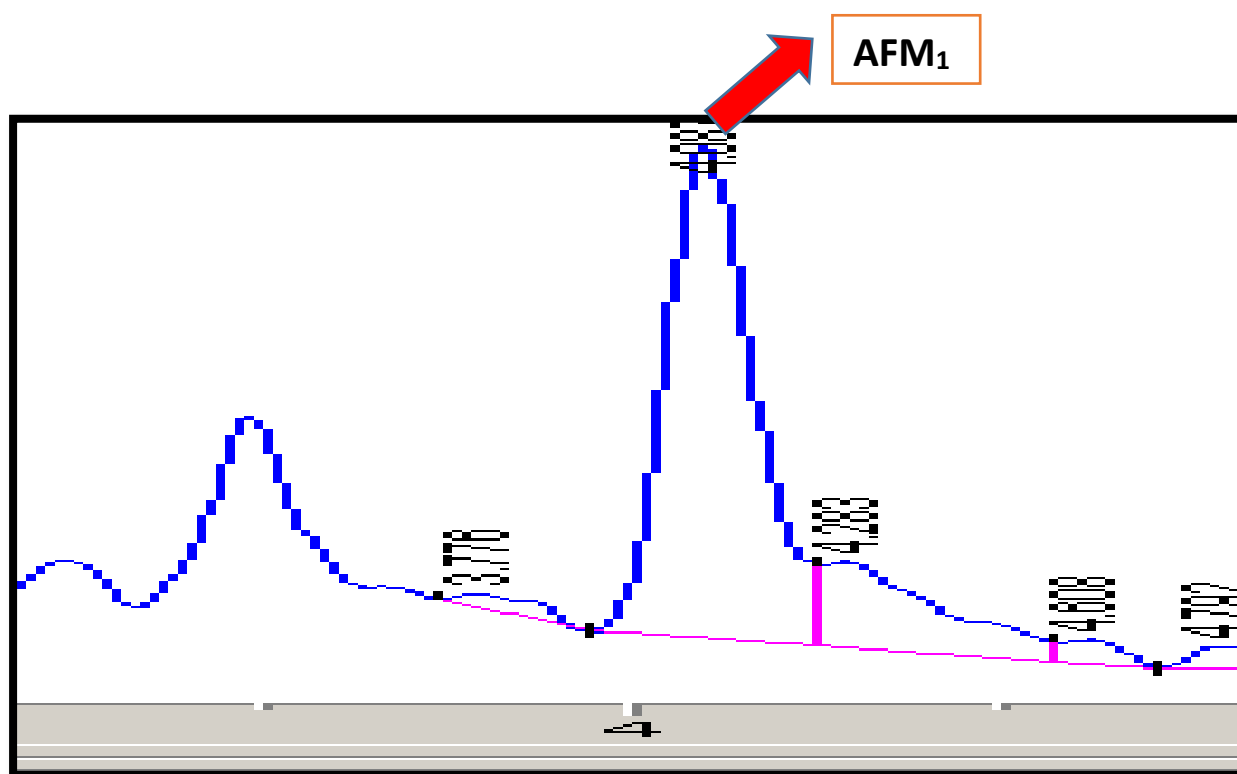
Codigo muestra	AFM1		correccion recuperacion (%R=70)
	Area	TR	
NE1.1	0,054	4,167	0,12
NE1.2	0,066	4,201	0,15
NE1.3	0,075	4,204	0,17
NE2.1	0,049	4,238	0,10
NE2.3	0,046	4,255	0,10
ND1.1	0,044	4,166	0,09
ND1.3	0,047	4,208	0,10
ND2.1	0,054	4,286	0,12
LD2.1	0,056	4,078	0,12
LD2.2	0,048	4,081	0,10
LD2.3	0,051	4,086	0,11
PE2.2.1	0,078	4,089	0,18
PE2.2.2	0,071	4,097	0,16
PE2.2.3	0,079	4,101	0,18
LD2.2.1	0,046	4,092	0,10
LD2.2.2	0,045	4,097	0,09

FUENTE: (Elaborado por autores)

ANEXO 3: Cromatogramas de AFM₁ por HPLC de Parmalat Entera UHT que se encontraron por encima del límite de cuantificación correspondiente al segundo muestreo realizado en el laboratorio de Alimentos y Nutrición del Proyecto VLIR-IUC “Alimentación, Nutrición y Salud” de la Universidad de Cuenca.



PICO	TIEMPO DE RETENCIÓN	AREA	Metabolito
1	3.714	1.61503 e ⁻³	
2	3.796	2.45881e ⁻³	
3	4.078	5.63456e ⁻²	AFM ₁
4	4.286	2.21054e ⁻²	
5	4.817	3.67087e ⁻³	



PICO	TIEMPO DE RETENCIÓN	ÁREA	METABOLITO
1	3.776	2.01230e ⁻³	
2	4.087	6.47094e⁻²	AFM₁
3	4.283	1.54404e ⁻²	
4	4.608	2.08671e ⁻³	
5	4.792	2.74879e ⁻³	

GLOSARIO

Cancerígeno.- agente físico, químico o biológico potencialmente capaz de producir cáncer al exponerse a tejidos vivos.

Detoxificación.- consiste en neutralizar y eliminar las toxinas que se encuentran y acumulan en el organismo causando cansancio y falta de energía, entre otros efectos. Se genera una serie de reacciones químicas que tendrán lugar en nuestro organismo, mediante las cuales las toxinas serán transformadas en sustancias menos tóxicas e hidrosolubles, para poder de ese modo eliminarlas con mayor facilidad.

Fungistaticos.- Sustancia que inhibe la actividad vital de los hongos.

Genotoxico.- agentes físicos o productos químicos capaces de alterar la información genética celular.

Inmunosupresivo.- La inmunosupresión es una reducción de la activación o la eficacia del sistema inmune. Algunas partes del sistema inmune en sí tienen efectos inmunosupresores en otras partes del sistema inmune, y la inmunosupresión puede ocurrir como una reacción adversa al tratamiento de otras afecciones.

Mutagénesis.- es aquella modificación del material genético que resulta estable y transmisible a las células hijas que surgen de la mitosis. Las lesiones generadas por estos agentes mutagénicos pueden resultar en modificaciones de las características hereditarias o la inactivación del ADN.

Síndrome de Kwashiorkor.- El kwashiorkor es una enfermedad de los niños debida a la ausencia de nutrientes, como las proteínas en la dieta. Los signos incluyen abombamiento abdominal, coloración rojiza del cabello y despigmentación de la piel. El abdomen abombado es debido a la retención de líquidos por ausencia de proteínas en la sangre y favorece el flujo de agua hacia el abdomen.

Teratogenicos.- es una sustancia, agente físico u organismo capaz de provocar un defecto congénito durante la gestación del feto.